

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ТОРФА НА ФАГОЦИТОЗ IN VITRO.

Витебская биофабрика.
Витебский государственный
медицинский университет.

Изучено влияние препаратов торфа (оксидат торфа, БСТ) на фагоцитирующую способность инфузорий. Показано их стимулирующее действие (в 1,6 - 1,8 раза) на поглощающую активность инфузорий по отношению *Bac. subtilis*.

В настоящее время разработано ряд препаратов из торфа, включая препарат БСТ и препарат биологически активный "Оксидат торфа" [8, 9], изучен их химический состав, иммуномодулирующая и биологическая активность [3, 7].

Целью настоящих исследований явилось изучение влияния вышеуказанных препаратов торфа на фагоцитоз in vitro.

В качестве биологической модели в опытах использовали культуру инфузорий *Colpoda steinii*.

Препарат "Культура *Colpoda steinii* сухая для экологотоксикологических исследований" широко используют для определения токсичности кормов, кормовых добавок, воды и др. [2]

Данная биологическая модель была нами избрана в связи с тем, что питание инфузорий осуществляется за счет фагоцитоза. В качестве пищи инфузории используют бактериальные и дрожжевые клетки, которые размножаются непосредственно в этом же сосуде, используя в качестве пищи какой-либо органический субстрат.

Таким образом, в ферментере создается трофическая система, в которой одновременно существуют два вида организмов, один из которых является "хищником", а другой — "жертвой".

Кроме них присутствует органический субстрат, являющийся единственным источником пищи для жертвы.

Математическую модель процесса взаимодействия типа "хищник - жертва" разработали Лотка и Вольтерра [1]

$$\frac{dX_1}{dt} = a \cdot X_1 - c \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = -b \cdot X_2 + n \cdot c \cdot X_1 \cdot X_2$$

где X_1 — концентрация жертвы, X_2 — концентрация хищника, a — коэффициент размножения жертвы в отсутствии хищника, b — коэффициент убывания численности хищника в отсутствии жертвы, c — мера вероятности того, что встреча хищника с жертвой окончится гибелью последней, n — коэффициент увеличения численности хищника за счет жертвы, t — время.

Эта модель описывает те системы, в которых присутствует избыток субстрата и малая (но не нулевая) концентрация хищника [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Культуры и штаммы микроорганизмов

В работе использовали препарат БСТ и препарат биологически активный "Оксидат торфа", изготовленные на Витебской биофабрике путем обработки торфа специальными методами.

Культура инфузорий *Colpoda steinii* была любезно предоставлена нам Френкель М.А. (лаборатория цитологии одноклеточных организмов института цитологии РАН).

Один из клонов *Colpoda steinii* был использован нами для получения меноксеничной культуры. Для этого одиночные клетки простейших отбирали тонко оттянутым капилляром и пятикратно отмывали в стерильном растворе Лозина—Лозинского, затем помещали в лунки планшетки со стерильной салатной средой, после чего вносили туда бактериологической петлей культуру бактерий *Bacillus subtilis*. Планшетку помещали во влажный эксикатор. Через трое суток инкубации операцию повторяли.

Штамм культуры *Colpoda steinii* сохраняли на салатной среде при 20—24°C, пересекали один раз в месяц.

Культура *Bacillus subtilis* ATCC 6633 была предоставлена нам ВГНКИ ветпрепаратов (г. Москва) и сохранялась на скошенном МПА при 4-8°C по общепринятой мето-

дике [6]. Пересев производили раз в два месяца. Одновременно проводили контроль чистоты культуры.

Питательные среды

Минеральный раствор Лозина-Лозинского готовили по общепринятой методике [4].

Для приготовления салатной среды в 1 л раствора Лозина-Лозинского помещали 1 г высушенных салатных листьев, кипятили в течение 30 мин, после охлаждения фильтровали через стерильный бумажный фильтр и разливали по 2,5 мл в чашки Петри.

В каждую чашку на конце микробиологической петли вносили культуру *Bacillus subtilis*.

Мясопептонный агар (МПА) для выращивания *Bacillus subtilis* готовили по общепринятой методике.

Аппаратура и измерения

Для культивирования инфузорий и бактерий использовали ферментер с мешалкой емкостью 5 л. Подачу воздуха в реактор осуществляли микрокомпрессором МЛ-2.

Для отмывки клеток *Bacillus subtilis* использовали центрифугу. Концентрацию инфузорий в среде определяли в камере Мак-Мастера.

Для этого в пробирку помещали 1 мл культуры и вносили равное количество фиксирующего раствора, приготовленного заранее путем добавления к раствору Лозина-Лозинского 0,1% глутарового альдегида, содержащее пробирки перемешивали, отбирали пипеткой 1 мл и помещали в камеру. Подсчет клеток вели под микроскопом при 35 \times . Если концентрация клеток инфузорий была велика, то фиксированную культуру разводили раствором Лозина-Лозинского в несколько раз. Расчет концентрации инфузорий в среде проводили по формуле:

$$X_2 = \frac{2 \cdot K \cdot X}{0,3} \text{ экз./мл,} \quad (2)$$

где: X_2 — концентрация инфузорий в культуре; 2 — кратность разведения фиксирующим раствором; K — кратность вторичного разведения; X — количество клеток в обоих квадратах камеры; 0,3 — объем камеры в мл.

Концентрацию бактерий в среде определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 540 нм по общепринятой методике.

Культивирование смешанной культуры *Colpoda steinii* и *Bacillus subtilis* выполняли в периодическом режиме.

В ферментер с мешалкой помещали питательную среду приготовленную из раствора Лозина-Лозинского с добавлением дрожжевого экстракта в концентрации 0,1% и различных количеств глюкозы. Ферментер автоклавировали в течение 45 минут при 115-118 $^{\circ}$ C. После охлаждения реактор устанавливали на рабочее место и среду инокулировали культурами *Bacillus subtilis* и *Colpoda steinii*.

В серии опытов в среду с культурами микроорганизмов добавляли препарат БСТ в разведении 10^1 - 10^4 и препарат биологически активный "Оксидат торфа" в разведении 10^2 - 10^4 .

К ферментеру подключали системы термостатирования, аэрации и pO_2 .

Температуру поддерживали на уровне 20-22 $^{\circ}$ C, скорость вращения мешалки 200 об/мин $^{-1}$. Периодически из ферментера отбирали пробы и определяли концентрации клеток *Colpoda steinii* и *Bacillus subtilis*. На основании результатов опытов строили графики и проводили математическое моделирование процесса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Следует отметить, что во время роста бактерии *Bacillus subtilis* закисляют, а инфузории *Colpoda steinii* защелачивают среду.

Культивирование смешанной культуры *Colpoda steinii* и *Bacillus subtilis* проводили в ферментере с мешалкой.

Во время культивирования смешанной культуры концентрация бактерий сначала повышалась экспоненциально, но затем скорость роста и концентрация их падала, что обусловлено фагоцитозом и "выеданием" их инфузориями (таблица).

При культивировании смешанной культуры *Colpoda steinii* и *Bacillus subtilis* в присутствии препаратов торфа БСТ и "Оксидат торфа" в концентрации 10^1 - 10^4 коэффициент хищничества, т.е. фагоцитоза был выше, чем в контроле соответственно в 1,7 - 1,8 и 1,6 - 1,73 раза, а константа полунасыщения по жертве — в 1,92 - 2,14 и 1,84 - 2,0 раза.

Таблица Значение констант в системе уравнений модели “жертва-хищник” в опыте и контроле.

Препарат торфа	Разведение препарата	Максимальная удельная скорость роста, ($ч^{-1}$)	Константа полунасыщения по субстрату (клет/л)	Усвояемость субстрата (фагоцитоз) (клет/экз.)
БСТ	10^1	0,213	$12,72 \cdot 10^{10}$	21492
	10^2	0,230	$14,038 \cdot 10^{10}$	22756
	10^3	0,215	$13,84 \cdot 10^{10}$	21866
	10^4	0,208	$12,60 \cdot 10^{10}$	21490
Оксидат торфа	10^1	0,196	$12,09 \cdot 10^{10}$	20227
	10^2	0,216	$13,13 \cdot 10^{10}$	21871
	10^3	0,202	$12,52 \cdot 10^{10}$	20894
	10^4	0,196	$12,07 \cdot 10^{10}$	20242
Контроль	-	0,183	$6,56 \cdot 10^{10}$	12640

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препараты из торфа БСТ и препарат биологически активный “Оксидат торфа” стимулируют фагоцитоз *in vitro* в 1,6 - 1,8 раза.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии.- Т.2.М.: Мир, 1989.- 590с.
2. Виноходов Д.О. Математическое моделирование кинетики роста культуры инфузорий *Colpoda steinii* // Архив ветеринарных наук. Санкт - Петербург, Ломоносов 1998, том 1(48), с. 121-134.
3. Временное наставление по применению биологически активного препарата БСТ-1.- Минск, 1997, 3с.
4. Кокова В.Е. Непрерывное культивирование простейших. Простейшие — новые объекты биотехнологии.- Протозоология. Вып. 12.- Л.: Наука. Лен. отд, 1989. - с. 113-141.
5. Ладыгина В.П. Изучение взаимодействия популяции хищника и жертвы в проточных системах. Динамика малых микробных экоси-

стем и их звеньев.- “Новосибирск”: Наука, Сиб. отд., 1981.- с. 20-60.

6. Методы общей бактериологии.- Т. 1.- М.: Мир, 1983.- 536с.
7. Наставление по применению препарата биологически активного “Оксидат торфа”.- Минск, 1998, 2с.
8. Технические условия РБ 00028493. 189-96. “Препарат БСТ для ветеринарных целей.- Минск, 1996, 12с.
9. Технические условия РБ 00483033. 001-98. “Препарат биологически активный “Оксидат торфа”.- Минск, 1998, 12с.

SUMMARY

V.V. ZHAITSEV, V.M. KOZIN.
THE INFLUENCE OF PEAT
OXYDATE PREPARATIONS ON
PHAGOCYTOSIS IN VITRO.

The influence of peat oxydate (peat oxydate, BSP) preparations on infusorian activity in phagocytosis conditions was studied. The stimulative effect of these preparations (in 1,6 - 1,8 fold) on infusorian absorption activity in according to *Bacillus Subtilis* was shown in reality.